

三标四色多重荧光染色 (TSA) 试剂盒

货号: RK05903

规格: 10T/50T

◆ 产品简介

本产品三标四色多重荧光染色 (TSA) 试剂盒, 适用于石蜡切片、冰冻切片与细胞爬片等免疫荧光多重染色, 尤其适用于相同来源一抗的多重荧光免疫标记, 也可用于不同来源抗体的多重荧光免疫标记。主要原理是基于酪胺信号放大 (TSA, Tyramide signal amplification), 以下简称 TSA 技术。TSA 技术主要原理是利用酪胺 Tyramide 的过氧化物酶反应 (即荧光标记的酪胺盐在 HRP 催化 H_2O_2 下形成共价键结合位点), 产生大量的酶促反应, 该产物能与周围的蛋白残基 (包括色氨酸、组氨酸、酪氨酸残基) 结合, 在抗原-抗体结合部位形成大量的荧光素沉积, 实现信号放大。还可以通过多次重复免疫标记, 使用不同的荧光酪胺实现多重荧光染色。

荧光光谱数据如下:

荧光染料类型	Ex/Em
TYR-520 绿色	490/520
TYR-570 红色	550/570
TYR-690	630/690

◆ 产品组成

产品编号	名称	规格 (10T/50T)	保存条件
RK05903-1	TYR-520 荧光染料 (绿光)	即用型, 0.5mL/2.5mL	-20°C
RK05903-2	TYR-570 荧光染料 (红光)	即用型, 0.5mL/2.5mL	-20°C
RK05903-3	TYR-690 荧光染料	即用型, 0.5mL/2.5mL	-20°C
RK05903-4	TSA+增强剂 (可选)	浓缩型, 5μL/25μL	-20°C
RK05903-5	HRP-山羊抗兔/鼠通用二抗	即用型, 1.5mL/7.5mL	4°C
	说明书	1 份	

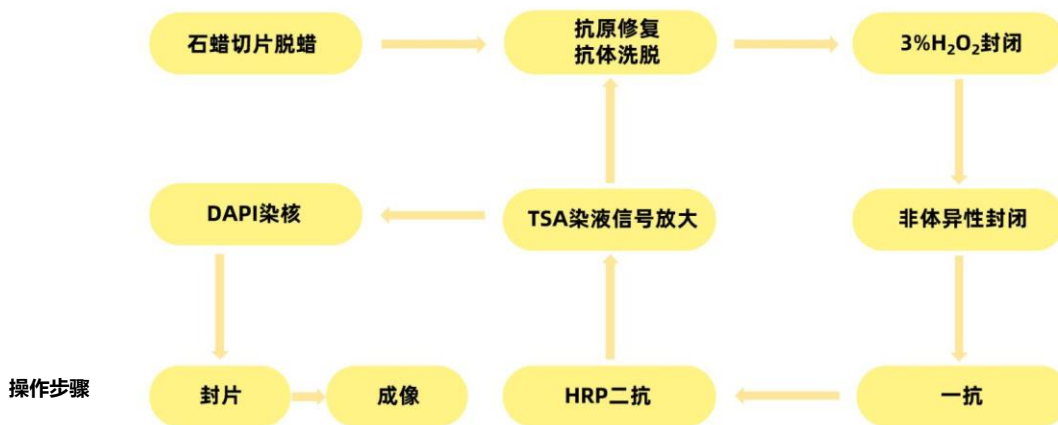
备注:

- 1、TYR 荧光染料及 TSA+增强剂在-20°C下均为固体, 使用之前需解冻。
- 2、TSA+增强剂使用方法: TSA+增强剂能够进一步增强荧光信号放大液的放大信号 5-10 倍, TSA+增强剂: TYR 荧光放大液 (即 TYR 荧光染料) =1:500, 使用 TSA+增强剂不是必须的选项, 可以根据具体的情况选择添加或者不选择添加。
- 3、10T/50T 测试次数满足条件为: RK05903-1、RK05903-2、RK05903-3 使用量为 50μL/T; RK05903-4 使用量为 0.5μL/T; RK05903-5 使用量为 150μL/T; 孔板大小不同, 加样量存在差异, 大于上述加样量, 以实际测试次数为准。

◆ 保存条件

试剂盒内各组分按各自所需条件保存, 冰袋 (wet ice) 运输。12 个月有效

◆ 操作流程图示



1、样本准备:

1) 石蜡切片: 依次将切片放入二甲苯 I 15min-二甲苯 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min-95%乙醇 5min-85%乙醇 5min-75%乙醇 5min, 蒸馏水洗。

2) 冰冻切片: 冰冻切片固定 10-30min, PBS 洗 5min, 重复 3 次, 滴加 0.1-0.5% triton-X100 破膜液通透 20min, PBS 洗 5min, 重复 3 次。

3) 细胞爬片或者细胞涂片: 细胞样本固定 10-30min, PBS 洗 5min 重复 3 次, 滴加 0.1-0.5% triton-X100 破膜液通透 20min, PBS 洗 5min, 重复 3 次。

2、抗原修复: 组织切片置于盛满 PH 9.0 EDTA 碱性抗原修复液或者 PH6.0 柠檬酸修复缓冲液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复 (也可以用高压 1-2min 100°C 水煮 15min 95°C 水浴 20min 等其他热修复方法)。中火 8min, 停火 8min, 转中低火 7min, 此过程中应防止缓冲液过度蒸发, 切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。(修复液和修复条件根据组织类型以及抗原类型来确定, 冰冻切片和细胞样本可省略此步骤)。

3、阻断内源性过氧化物酶: 切片放入 3%过氧化氢溶液, 室温避光孵育 15min, 将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。

4、BSA 封闭: 切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈 (防止抗体流走), 在圈内滴加用 3%BSA-PBS (或者其他封闭液) 均匀覆盖组织, 室温封闭 30min。

5、加一抗: 轻轻甩掉封闭液, 在切片上滴加用抗体稀释液稀释好的的一抗 X, 切片平放于避光湿盒内 4°C 孵育过夜或者 37°C 2h (湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。

6、加 hrp 二抗: 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的 hrp 二抗覆盖组织, 避光室温孵育 50min, PBS 洗三次。

7、荧光染料反应: 切片滴加即用型荧光反应液均匀覆盖组织室温反应 2-15min, PBS 洗三次 (预实验可先染 3min 洗干净荧光染料后显微镜下观察染色效果, 如果阳性弱继续滴加荧光染料加强染色强度直至合适继续进行后续抗体染色流程)。

8、抗体洗脱: 石蜡切片置于抗原修复液中 95°C 水浴 25-40min (根据不同抗体亲和力 灵活调整时间) 或者 滴加适量 37°C 预热至完全溶解的 mlHC 专用抗体洗脱液 (冰冻切片 爬片 骨组织建议用, 推荐货号 RM02984) 覆盖样本, 37°C 放置 5-20min, 弃去洗脱液, 再次滴加适量抗体洗脱液覆盖样本 37°C 放置 5-20min, 弃洗脱液, PBS 洗三次, 每次 5min (石蜡切片可用热修复洗脱或者抗体洗脱液洗脱, 细胞及冰冻切片需用抗体洗脱液进行洗脱)。

9、重复 3-8 步骤 (换用另外一种 TYR 荧光染料) ---第二轮标记

10、重复 3-7 步骤 (换用另外一种 TYR 荧光染料) ---第二轮标记

11、DAPI 复染细胞核: 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10min。

12、封片: 玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。

13、镜检拍照: 切片于荧光显微镜/共聚焦/多通道荧光扫描仪/多光谱成像系统下观察并采集图像。

◆ 注意事项

1. 一抗需要经过 IHC 检测验证, 满足 IHC 应用后, 按说明书推荐的 IHC 稀释比使用。建议设置一抗梯度浓度获得最佳效果。10T/50T, 对应使用量为 50μL/1T, 需注意: 若实验条件差异, 导致用量过多则无法满足使用 50 次的需求, 例如细胞爬片 6 孔板和 12 孔板, 使用量较大, 则无法满足 50 次使用次数;

2. 如背景荧光较强, 建议增加组织自发荧光淬灭步骤;

3. 荧光 TYR 为即用型, 如需增强信号, 可使用 TSA+增强剂, 能够进一步增强荧光信号放大液的放

大信号 5-10 倍。TSA+增强剂与 TYR 荧光染料混合后可具有荧光增强效果, 混合比例建议使用 "TSA+增强剂: TYR 荧光染料= 1:500" 的稀释比, 可根据实验结果调整稀释比例 (调整范围 1:200 - 1:1000, 使用 TSA+增强剂不是必须的选项, 可以根据具体的情况选择添加或者不选择添加) ;

4. 如进行多重荧光标记, 建议先孵育多抗, 后孵育单抗; 先孵育低丰度目的蛋白对应的抗体, 再孵育高丰度目的蛋白对应的抗体;

5. 本产品适用于石蜡切片、冰冻切片 (贴片) 与细胞爬片等免疫荧光多重染色; 该产品不建议应用于冰冻漂片, 如尝试, 请自行优化实验条件;

6. 本产品仅限科研使用。